

012399754

WPI Acc No: 1999-205861/199918

XRAM Acc No: C99-060151

**Microfiltration layer for removing endotoxins from liquids**

Patent Assignee: GES BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBFB )

Inventor: ANSPACH B; BEESKOW T; DECKWER W; PETSCH D

Number of Countries: 021 Number of Patents: 002

Basic Patent:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 19740770	A1	19990318	DE 1040770	A	19970917	199918 B

Priority Applications (No Type Date): DE 1040770 A 19970917; WO 98EP5974 A  
19980918

Designated States (National): CA; JP; US

Designated States (Regional): AT; BE; CH; CY; DE; DK; ES; FI; FR; GB; GR;

IE; IT; LU; MC; NL; PT; SE

Abstract (Basic): DE 19740770 A1

NOVELTY - A microfiltration filter layer, for removal of endotoxins from liquid media, includes covalently bonded ligands for endotoxins, carried by a polymer applied to the filter layer material.

USE - Use of the layer is claimed for removing endotoxins from liquid media, especially water, protein solutions or parenteral solutions. Typical applications are haemodialysis; production of safe infusion or injection solutions or diagnostic agents (e.g. antibodies); production of biological drugs (including high-molecular drugs such as proteins); treatment of biotechnological process waters and raw materials; and decontamination of products.

ADVANTAGE - Endotoxins are almost completely removed, e.g. to give a residual concentration of below 1 EU per ml or below the detection limit of the limulus amebocyte lysate (LAL) test. The endotoxins are removed selectively, so that proteins can be decontaminated without reduction of endotoxin removal capacity and loss of product due to simultaneous adsorption of the protein.

pp; 15 DwgNo 0/2

Title Terms: LAYER; REMOVE; ENDOTOXIN; LIQUID

Derwent Class: A96; B04; D15; D22; J01

International Patent Class (Main): B01D-069/02; B01J-020/32

International Patent Class (Additional): B01D-015/00; B01D-061/00;

B01D-061/14; C02F-001/44

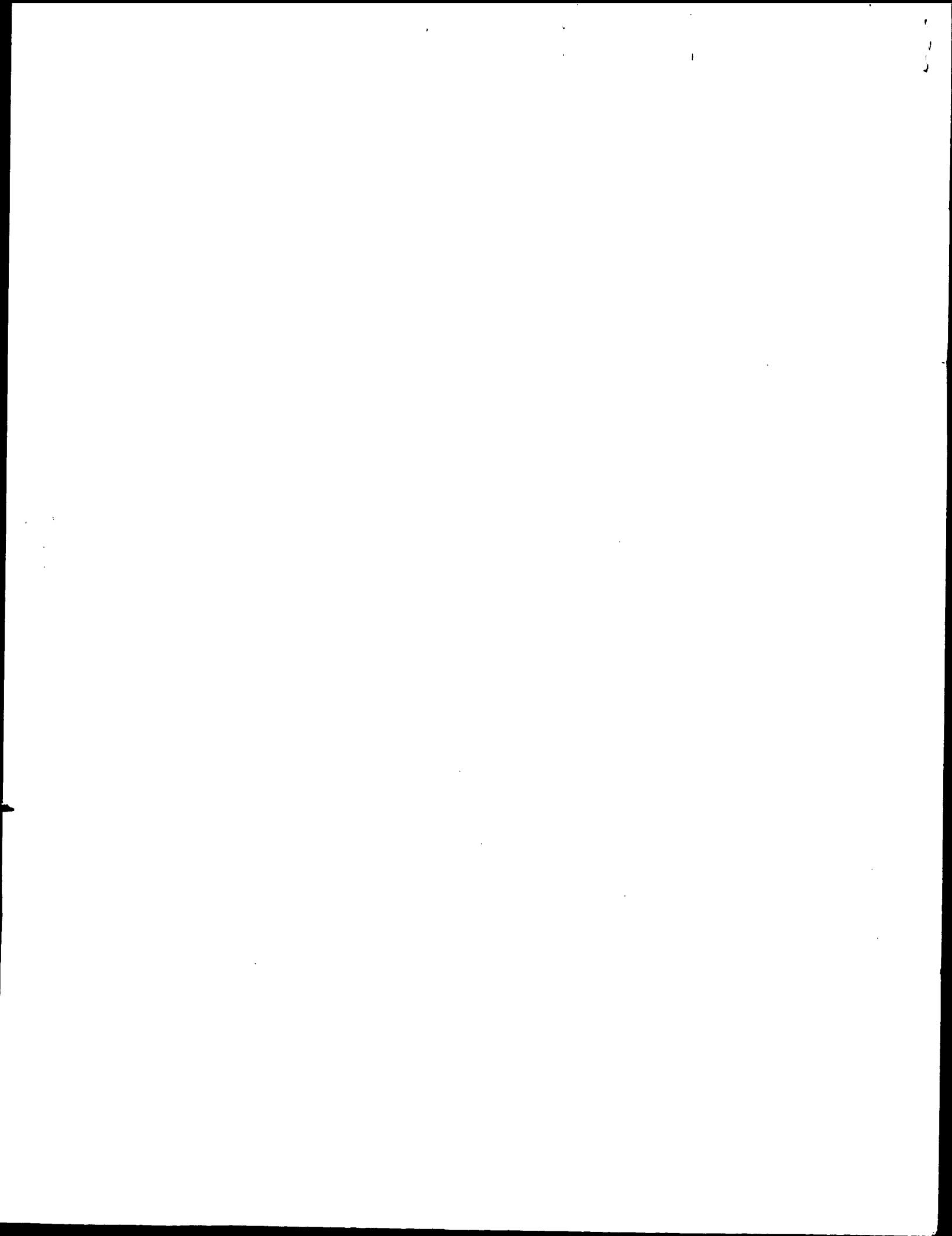
011494054

WPI Acc No: 1997-471967/199744

XRAM Acc No: C97-150123

XRPX Acc No: N97-393485

**Micro-filtration membrane for selective endotoxin removal - having ligand for endotoxin covalently bonded via polymer carrier, used e.g. for**





(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**  
(10) **DE 197 40 770 A 1**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**B 01 D 69/02**

C 02 F 1/44  
B 01 D 61/14  
// C08L 33/20,81/06,  
77/00,29/04,25/06,  
33/08,5/00

(21) Aktenzeichen: 197 40 770.6  
(22) Anmeldetag: 17. 9. 97  
(43) Offenlegungstag: 18. 3. 99

(71) Anmelder:  
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH  
(GBF), 38124 Braunschweig, DE

(74) Vertreter:  
Patentanwälte Dr. Boeters, Bauer, Dr. Forstmeyer,  
81541 München

(72) Erfinder:  
Beeskow, Thomas, 37194 Wahlsburg, DE; Deckwer,  
Wolf-Dieter, Prof. Dr., 26129 Oldenburg, DE;  
Anspach, Birger, Dr., 38300 Wolfenbüttel, DE;  
Petsch, Dagmar, 38302 Wolfenbüttel, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(51) Mikrofiltrationsfilterschicht sowie deren Verwendung  
(57) Die Erfindung betrifft eine Mikrofiltrationsfilterschicht zur Abtrennung von Endotoxinen aus flüssigen Medien, insbesondere Wasser, Proteinlösungen oder Parenteralien, die durch kovalent gebundene Liganden für Endotoxine, wobei die Liganden von einem Polymeren getragen werden, das auf dem Filterschichtmaterial aufgebracht ist, gekennzeichnet ist.

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Mikrofiltrationsfilterschicht zur Abtrennung von Endotoxinen aus flüssigen Medien sowie die Verwendung dieser Mikrofiltrationsfilterschicht.

Endotoxine sind Lipopolysaccharide aus der äußeren Zellfilterschicht Gram-negativer Bakterien, die als Pyrogene wirken. Aufgrund der Allgegenwärtigkeit von Bakterien sind auch Endotoxine ubiquitär. Sie können im Gegensatz zu Bakterien jedoch nicht durch Standard-Methoden wie Sterilfiltrieren oder Autoklavieren entfernt bzw. unschädlich gemacht werden (1). Aus diesem Grund ist steril nicht gleichbedeutend mit endotoxin-frei. Besonders kritisch ist die Anwesenheit von Endotoxinen in Injektions- bzw. Infusionslösungen (Parenteralia), da sie intravenös appliziert bereits in Mengen von 1 ng pro kg Körpergewicht fiebertrengend wirken. Die Symptomatik reicht bei entsprechend hoher Dosierung (z. B. durch großvolumige Parenteralia) bis zu schwerem Schock und Tod (2, 3). Daher schreiben fast alle pHarmacopöen neben der Keimfreiheit strenge Endotoxin-Höchstwerte vor: z. B. 0.2 EU pro mg Chloramphenicol zur Injektion oder nur 0.003 EU pro Heparin-Unit (4). Die Erfüllung dieser Forderungen bereitet in der Praxis einige Schwierigkeiten. Insbesondere die Produktion biologischer Arzneimittel kann nicht in allen Schritten endotoxinfrei erfolgen. Als Endotoxin-Quellen kommen hauptsächlich in Frage:

- Rohstoffe wie Plasma oder Gewebe, die bereits Bakterien-kontaminiert sein können.
- Bei rekombinanten Produkten ist mit dem Eintrag von Host-spezifischen Endotoxinen zu rechnen.
- Bakterielle Kontamination von Geräten, Filtern oder Hilfsstoffen während der Herstellung.

Die für thermostabile Wirkstoffe übliche Hitzedekontamination (30 Minuten bei 250°C) ist für die Präparate ebenso wenig geeignet wie Behandlung mit Säuren, Laugen oder stark oxidierenden Agensien ( $H_2O_2$ ) (1).

Beim Einsatz von Aktivkohle sind häufig merkliche Produktverluste zu verzeichnen, so daß ihre Anwendung auf die Wasseraufbereitung beschränkt bleibt (5, 6).

Die Ultrafiltration hat als sehr schonende Methode große Popularität auf dem Gebiet der Endotoxin-Entfernung erlangt. Hierbei wird i.a. mit cut-offs von 10 000 oder 5000 gearbeitet, um auch monomere Bestandteile (MW ca. 14000) wirkungsvoll abzutrennen, die neben hochmolekularen Aggregaten (bis zu mehreren Millionen Molekulargewicht) vorliegen. Trotzdem treten immer wieder Probleme mit niedermolekularen Spaltstücken auf, die ebenfalls pyrogen wirken (z. B. Lipid A). Das betrifft vor allem die Hämodialyse: Obwohl die Dialysepuffer ultrafiltriert werden, entwickeln z. B. in den USA jährlich 400 000 Hämodialyse-Patienten septische Symptome (7). – Die Notwendigkeit der kleinen cut-offs beschränkt die Anwendung der Ultrafiltration zudem auf die Dekontaminierung niedermolekularer Substanzen (8).

Im Fall von hochmolekularen Produkten wie pHarmaproteinen, Albumin-Präparaten oder Heparin existieren nach wie vor große Schwierigkeiten: Treten in diesen Präparaten Endotoxin-Verunreinigungen auf, bleibt gegenwärtig nur die Möglichkeit des Reprozessierens, um den Vorschriften von FDA, USP oder EP gerecht zu werden.

Um dieses aufwendige Verfahren zu vermeiden, das Produkt aber trotzdem seiner Bestimmung zuzuführen, wurde die Möglichkeit geprüft, verseuchte Produkte über chromatographische Sorbentien mit endotoxin-spezifischen Liganden selektiv zu dekontaminieren. Auch dies brachte nicht

den gewünschten Erfolg: Bisher beschriebene Affinitätsorbentien mit His, His, PMB als Liganden erwiesen sich trotz hoher bis sehr hoher Assoziationskonstanten bei hohen Endotoxin-Eingangskonzentrationen als nicht geeignet (9).

Ferner wurde in Gegenwart von Proteinen konkurrenzende Proteinadsorption beobachtet, die zu verringerten Endotoxin-Abreicherungsraten und teilweise hohen Proteinverlusten führte (insbesondere bei sauren Proteinen wie BSA).

10

## Literatur

- (1) S.K. Sharma  
Endotoxin detection and elimination in biotechnology  
Biotechnol. Appl. Biochem. 8 (1986), 5-22
- (2) N. Haefner-Cavaillon, J.M. Cavaillon, L. Szabó  
Cellular receptors for endotoxin Handbook of Endotoxins, Vol. 3: Biology of Endotoxins, 1-24 Elsevier Science Publishers B.V. (1985)
- (3) D.C. Morrison, J.L. Ryan  
Endotoxins and disease mechanisms Ann. Rev. Med. 38 (1987), 417-32
- (4) USP XXII Suppl. 5 (Nov. 1991)
- (5) K.C. Hou, R. Zaniewski  
Depyrogenation by endotoxin removal with positively charged depth filter cartridge J. Parenteral Sci. Tech., Vol. 44, No. 4 (1990), 204-209
- (6) CUNO Newsletter for pHarmaceuticals (Okt. 1995), S. 3
- (7) B.P. Smollich, D. Falkenhagen, J. Schneidewind, S. Mitzner, H. Klinkmann  
Importance of endotoxins in high-flux dialysis Nephrol. Dial. Transplant 3 (Suppl.) (1991) 83-85
- (8) E. Flindt  
Pyrogenentfernung mittels Ultrafiltration Memoscript CONCEPT-Symposium "Pyrogene II" (Juni 1983), S. 54-60
- (9) F.B. Anspach, O. Millbeck  
Removal of endotoxins by affinity sorbents J. Chromatogr. A 711 (1995), 81-92.

Dieser Stand der Technik läßt sich erfindungsgemäß durch eine Mikrofiltrationsfilterschicht zur Abtrennung von Endotoxinen aus flüssigen Medien, insbesondere Wasser, Proteinslösungen oder Parenteralien verbessern, wobei die Mikrofiltrationsfilterschicht durch kovalent gebundene Liganden für Endotoxine gekennzeichnet ist, wobei die Liganden von einem Polymeren getragen werden, das auf der Filterschicht aufgebracht ist.

Zur Filterschichttechnologie und auch Filterschichtherstellung kann auf C. Dickenson, Filters and Filtration Handbook, Elsevier Science Publishers, Oxford 1992, sowie Ho & Sirkar (Herausgeber), Membrane Handbook, Verlag von Nostrand Reinhold, New York, 1992, verwiesen werden. Insbesondere kann es sich bei den Filterschichtmaterialien um Tiefenfilter handeln.

Bei den kovalent gebundenen Liganden kann es sich um

- (a) einen endotoxin-spezifischen Liganden, vorzugsweise Histamin, Histidin, Polyethylenimin, Poly-L-lysin oder Polymyxin B und/oder
- (b) einen per se nicht-endotoxin-spezifischen Liganden handeln, vorzugsweise Diaminohexan, Diethylaminoethyl oder Desoxycholat.

Bei dem Filterschichtmaterial für die erfindungsgemäß Mikrofiltrationsfilterschicht kann es sich um Polysaccharide, z. B. Zellulose, insbesondere regenerierte und mikrokristalline Zellulose und -derivate, insbesondere Zellulose-

2

acetat, Agarose und -derivate, quervernetztes Dextran und -derivate, Chitosan und -derivate.

Synthetische organische Polymere, z. B. Polyacrylnitril, Polysulfon, Polyamid, insbesondere Nylon, Polyvinylalkohol, Polyethylenvinylalkohol, Polystyrol und Polyacrylate sowie deren Derivate.

Anorganische Materialien, z. B. Kieselgel, Glas und keramische Träger sowie deren Derivate handeln.

Die Materialien können faserförmig oder partikulär, spärlich oder unregelmäßig geformt mit porösem oder unporösem Aufbau vorkommen, wie sie beispielsweise für chromatographische Träger zum Einsatz kommen; ebenso können Teile anderer Strukturen eingesetzt werden, wie z. B. Bruchstücke oder speziell zugeschnittene Hohlfasermembranen, gebrochene Partikel oder Perlen. Vorzugsweise sollten die Materialien wasserunlöslich sein.

Die Größe der Grundstoffe wird so gewählt, daß die herstellende Struktur in der Schicht einen Porendurchmesser aufweist, wie er für die Mikrofiltration gebräuchlich ist, insbesondere zwischen 0,1 und 10 µm.

Bei dem Polymeren, das auf die erfundungsgemäße Mikrofiltrationsfilterschicht aufgebracht ist, kann es sich um ein hydrophiles Polymere handeln, insbesondere um Dextran, Polyvinylalkohol oder modifizierte Zellulose, vorzugsweise Hydroxyethylzellulose.

Dieses hydrophile Polymere kann für sich wasserlöslich, in Wasser quellbar oder wasserunlöslich sein.

Das Polymere kann von der erfundungsgemäßen Mikrofiltrationsfilterschicht mit Hilfe eines Spacers getragen werden. Auch die kovalent gebundenen Liganden können von einem Spacer getragen werden. Bei diesen Spacern kann es sich um Spacers handeln, die sich von Bisoxiran, Glutardialdehyd, Epihalogenhydrin oder Diisocyanat herleiten, gegebenenfalls nach oxidativer Aktivierung.

Zur Aktivierungs- und Immobilisierungsschemie, die auch auf endotoxin-spezifische Liganden und Spacer eingeht, sei beispielsweise auf Hermanson, Mallia & Smith, Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press Inc., San Diego, 1992, verwiesen.

Erfundungsgemäß werden also Mikrofiltrationsfilterschichten vorgesehen, die in geeigneter Weise oberflächenmodifiziert sind und aus Wasser und wäßrigen Lösungen (Puffer, Proteinlösungen) Endotoxine entfernen. Die Oberflächenmodifikation kann im Aufbringen eines bifunktionellen kovalent gebundenen Spacers bestehen, der mit einem hydrophilen Polymeren ungesetzt wird, wobei unspezifische Wechselwirkungen der Filterschicht, speziell mit Proteinen, reduziert werden. Das kovalent gebundene hydrophile Polymere kann mit endotoxin-spezifischen Liganden umgesetzt werden, gegebenenfalls über einen weiteren Spacer. Zum Prinzip der Oberflächenmodifikation der Filterschicht vergleiche man Fig. 1.

Der Endotoxin-Abreicherungserfolg kann sich in Gegenwart von Proteinen als abhängig von der Nettoladung der Proteine erweisen. Durch Optimierung der Bedingungen (pH-Wert) können saure Proteine (wie BSA und Maus-IgG 1) vollständig dekontaminiert werden, und zwar ohne nennenswerte Verluste an Protein. Im Fall basischer Proteine (wie beispielsweise Lysozym und bFGF) lassen sich ebenfalls hohe Abreicherungen erzielen.

Polymer-gecoatete erfundungsgemäße Mikrofiltrationsfilterschichten mit kovalent gebundenen endotoxin-spezifischen Liganden können Endotoxine in einem Durchgang entfernen, und zwar auch aus hochbelasteten Lösungen ( $6000 \text{ EU ml}^{-1}$ ).

Vom Prinzip her sind die Filterschichten entsprechend Fig. 1, aufgebaut. Zunächst wird über einen Spacer ein hydrophiles Polymer aufgebracht, das dann weiter, ggf. über

einen Spacer, mit endotoxin-spezifischen Liganden umgesetzt wird. Als Filterschichtmaterialien kommen insbesondere in Frage:

- 5 – Polysaccharide, wie
- Zellulose, insbesondere regenerierte und mikrokristalline Zellulose und -derivate, insbesondere Zelluloseacetat,
- Agarose und -derivate, quervernetztes Dextran und -derivate,
- Chitosan und -derivate,
- Synthetische organische Polymere, wie
- Polyacrylnitril sowie dessen Derivate
- Polysulfon sowie dessen Derivate
- Polyamid, insbesondere Nylon, sowie dessen Derivate
- Polyvinylalkohol sowie dessen Derivate
- Polyethylenvinylalkohol sowie dessen Derivate
- Polystyrol sowie dessen Derivate und
- Polyacrylate sowie deren Derivate,
- Anorganische Materialien wie
- Kieselgel sowie dessen Derivate
- Glas und
- keramische Träger.

Als Spacer eignen sich reaktive bifunktionale Verbindungen. Speziell geeignet sind:

- Bisoxiran
- Glutardialdehyd
- Epihalogenhydrin
- Diisocyanate

Zur Aktivierung der bei Verwendung von Bisoxiran und Epihalogenhydrin entstehenden vicinalen Diolbindung kann ggf. Oxidation durch Periodat angewandt werden, wobei eine Aldehydgruppe entsteht. Der an die Filterschicht gebundene Spacer wird weiter umgesetzt mit hydrophilen Polymeren. Als solche kommen bevorzugt in Frage:

- Dextran
- Polyvinylalkohol (PVA)
- Modifizierte Zellulosen, speziell Hydroxyethylzellulose (HEC)

Die weitere Reaktion erfolgt entweder direkt mit dem endotoxin-spezifischen Liganden oder wiederum über die Vermittlung eines der oben angeführten Spacers, ggf. nach dessen oxidativer Aktivierung. Als endotoxin-spezifische Liganden wirken (s. Liste der Abkürzungen): DAH, HinI, His, PEI, PLL, PMB. Auch die üblicherweise nicht endotoxin-spezifischen Liganden wie DEAE und DOC erwiesen sich in der Filterschichtkonfiguration als hochspezifisch bei gleichzeitig hoher Wiederfindung der Proteine.

Die Leistungsfähigkeit der entwickelten Filterschichten geht aus den angeführten Beispielen hervor. Die Endotoxin-Entfernung kann fast immer als vollständig bezeichnet werden. Sie liegt in der Regel unter  $1 \text{ EU ml}^{-1}$ , oft unterhalb der Nachweisgrenze mit dem LAL-Test.

60 An Kontrollfilterschichten (Nylon ohne Modifikation und mit aufgebrachtem hydrophilem Polymer mit oder ohne Spacer) ohne endotoxin-spezifischen Liganden wurde keine Endotoxinabreicherung erhalten.

Die neuen Filterschichten können eingesetzt werden zur Endotoxinentfernung aus Wasser und parenteralia. Auch in Gegenwart von Proteinen werden gute Ergebnisse erzielt. Im Fall basischer Proteine ist allerdings zu berücksichtigen, daß Wechselwirkungen der Proteine mit dem Endotoxin

aufreten können, die zu einer endotoxischen Maskierung führen können. Proteingebundenes Endotoxin kann mit dem LAL-Test nicht eindeutig nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß nicht endgültig geklärt ist, ob proteingebundenes Endotoxin noch toxisch wirkt.

Die erfundungsgemüßen Filterschichten können vielseitig angewandt werden.

Medizinisch-pharmazeutischer Bereich:

- Hämodialyse.
- Unbedenkliche Infusions- und Injektionslösungen (Parenteralia)
- Sichere Diagnostika (z. B. Antikörper)

In der Biotechnologie:

- Herstellung von pHartaprodukten.
- Endotoxin-Abreicherung in Prozeßwasser und Rohstoffen.
- Dekontaminierung von Produkten (Aufwand für Prozessierung entfällt)

## Methoden

### 1. Herstellung der Filterschichten

An Mikrofiltrationsfilterschichten werden hydrophile Polymere, insbesondere Dextran, Polyvinylalkohol und Hydroxyethylzellulose kovalent gebunden. Im nächsten Schritt werden an die aufgebrachten Polymere endotoxin-spezifische Liganden immobilisiert. Fig. 1 illustriert den Aufbau eines Filterschichtmaterials auf der Basis von Nylon.

#### 1.1. Coating einer Filterschicht am Beispiel von Dextran

Mikrofiltrationsfilterschichten, z. B. auf der Basis von Nylon-Hohlfasern oder Zellulosefasern, werden zunächst mit Bisoxiran aktiviert:

Solche Schichten auf der Basis von Nylon-Hohlfasern werden 16 Stunden bei 80°C in einer Reaktionslösung aus 1 ml 25 mM Natriumcarbonat (pH 11), 1 ml Ethanol (96%-ig) und 9 ml Bisoxiran inkubiert (Fig. 2a).

Solche Schichten auf der Basis von Zellulosefasern werden hierzu drei Stunden bei Raumtemperatur in einer Mischung aus 100 mg Natriumborhydrid in 15 ml 2 M Natronlauge, 25 ml Wasser und 5 ml Bisoxiran geschüttelt.

Jeweils beide Filterschichten werden anschließend nach gründlichem Waschen mit 5 ml einer 20-prozentigen Dextran 40 000-Lösung (pH 11) 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (s. Abb. 2b am Beispiel Nylon). Anschließend werden die Filterschichten 14 Stunden bei 120°C getrocknet. Um unspezifisch gebundenes Dextran zu entfernen, werden die Filterschichten dreimal mit 0,1 M Natronlauge und dann dreimal mit Wasser gewaschen.

Wie Fig. 3 zeigt, zeichnen sich die Filterschichten auf der Basis gecoateter Filterschichtmaterialien durch signifikant geringere unspezifische Wechselwirkungen – ausgedrückt durch adsorbierte Menge Hämoglobin – aus.

Aus der Fig. 3 geht auch hervor, daß mit einem einfachen Dextran-coating nicht der gleiche Effekt erreicht werden kann wie mit PVA und HEC. Durch einen zweiten Layer kann eine weitere Verbesserung erzielt werden, während ein dritter Layer nur noch geringfügige Auswirkungen hat. Dextran wurde daher immer als Doppel-coating eingesetzt.

### 1.2. Immobilisierung von endotoxin-spezifischen Liganden

Die Liganden PLL, PMB und PEI werden entweder direkt an die Perjodat-aktivierten Coating-Polymere oder nach Inkorporation eines Perjodat-oxidierbaren Spacers (Bisoxiran) immobilisiert. Das Vorgehen ist beispielhaft in Fig. 4 dargestellt. DEAE wird ohne Spacer direkt an die Matrices gekoppelt, die anderen niedermolekularen Liganden wurden über Epibromhydrin gebunden.

#### 1.2.1. PEI-Immobilisierung über Bisoxiran

Zur Aktivierung werden die mit hydrophilen Polymeren gecoateten Filterschichten drei Stunden bei Raumtemperatur in einer Mischung aus 100 mg Natriumborhydrid, 5 ml Bisoxiran und 45 ml 1 M Natronlauge inkubiert. Nach Hydrolyse des freien Oxiranringes (30 Minuten Inkubation bei pH 2,5) und Perjodatoxidation des erhaltenen vicinalen Diols (90 Minuten Inkubation in 0,2 M Natriumperjodat) werden die Filterschichten zwei Stunden mit einer Lösung von 0,5 g PEI (MW 50 000) in 0,1 M pHosphatpuffer, die auf pH 8 eingestellt wird, bei Raumtemperatur umgesetzt, so daß sich der in Fig. 1 gezeigte Aufbau ergibt. Abschließend wird mit einer 1-molaren Natriumchlorid-Lösung und Wasser gewaschen.

#### 1.2.2. Histidin-Immobilisierung

Histidin wird über DAH an Epibromhydrin-aktivierte gecoate Filterschichten immobilisiert. Epibromhydrin-Aktivierung wird wie für Bisoxiran beschrieben durchgeführt. Immobilisiertes DAH wird durch 8-niinütige Reaktion mit einer Mischung von 5 ml Epibromhydrin und 5 ml 4 M Natronlauge bei 90°C aktiviert und sofort bei 80°C mit L-Histidin umgesetzt (0,5 g L-Histidin in 20 ml Wasser, pH 12). Die fertige Filterschicht wird mit 1 M Natriumchlorid und Wasser gewaschen.

Entsprechende Vorschriften werden angewandt für das Coating mit anderen Polymeren und die kovalente Bindung mit den anderen endotoxin-spezifischen Liganden.

### 2. Weitere Methode zur Herstellung der Filterschichten

Als Alternative zu der unter 1. genannten Methode können zuerst die Filterschichtmaterialien chemisch modifiziert und im Anschluß daran die Struktur der Filterschicht durch Anschwemmen der Filterschichtmaterialien auf einen geeigneten Grundkörper hergestellt werden.

Hierzu werden an die Filterschichtmaterialien hydrophile Polymere, insbesondere Dextran, Polyvinylalkohol und Hydroxyethylzellulose kovalent gebunden. Im nächsten Schritt werden an die aufgebrachten Polymere endotoxin-spezifische Liganden immobilisiert. Die Struktur an den Filterschichtmaterialien wird ebenso durch Fig. 1 wiedergegeben.

#### 2.1 Coating eines Filterschichtmaterials am Beispiel von Sepharose 4B und Dextran

Sepharose 4B wurde nach einer Vorschrift von Sundberg und Porath (J. Chromatogr. 90, 1974, 87) mit Bisoxiran aktiviert. In Abänderung zur Vorschrift wurde die Reaktionsdauer auf 2 Stunden reduziert, um einen minimalen Verlust an Oxirngruppen sicherzustellen. Hierzu wurden 40 ml einer Sepharose 4B-Suspension mit 20 ml einer 0,5-molaren NaOH-Lösung, 8 ml Bisoxiran und 40 mg Natriumborhydrid in einem Kolben vereint und bei 40°C über einen Zeitraum von 2 Stunden geschüttelt. Anschließend wurde die aktivierte Sepharose abgesaugt und mehrmals mit Wasser

gewaschen. Das aktivierte Gel wurde mit dem gleichen Volumen einer Reaktionslösung vereint, die aus 20% Dextran mit einem mittleren Molekulargewicht von 40 000 und 0.2% Natriumborhydrid in einem 0.025-nmolaren Carbonatpuffer bestand und auf pH 11 eingestellt war. Diese Lösung wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die gecoate SepHarose wurde von der Dextranslösung durch Filtration getrennt und anschließend über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 80°C inkubiert.

## 2.2 Immobilisierung von endotoxin-spezifischen Liganden

Die Liganden PLL, PMB und PFI wurden entweder direkt an die Perjodat-aktivierten Coating-Polymeren oder nach Inkorporation eines Perjodat-oxidierbaren Spacers (Bisoxiran) immobilisiert. DEAB wurde ohne Spacer direkt an die Matrices gekoppelt, die anderen niedermolekularen Liganden wurden über Epibromhydrin gebunden.

### 2.2.1 Immobilisierung von PEI über Bisoxiran

Die Aktivierung der Dextrans-gecoatenen SepHarose mit Bisoxiran erfolgte nach Sundberg und Porath, wie in 2.1 beschrieben. Nach Hydrolyse des freien Oxiranringes (30 Minuten Inkubation bei pH 2.5) und Perjodatoxidation des erhaltenen vicinalen Diols (90 Minuten Inkubation in 0.2 M Natriumperjodat) wurden die Filterschichtmaterialien zwei Stunden bei Raumtemperatur mit einer Lösung versetzt, die auf pH 8 eingestellt und aus 0.5 g PEI mit einem mittleren Molekulargewicht von 50 000 und 10 ml eines 0.1-molaren pHospHapuffers zusammengesetzt war. Abschließend wurde mit 1 M Natriumchlorid-Lösung und Wasser gewaschen. Die Mischungsverhältnisse von Festkörper und Reaktionslösung wurden bei den einzelnen Reaktionen jeweils so gewählt, daß eine schüttelbare Suspension entstand.

### 2.2.2. Immobilisierung von Histidin

Histidin wurde über DAH an Epibromhydrin-aktivierte gecoate Filterschichtmaterialien immobilisiert. Epibromhydrin-Aktivierung wurde wie für Bisoxiran beschrieben durchgeführt. Immobilisiertes DAH wurde durch 8-minütige Reaktion mit einer Mischung von 5 ml Epibromhydrin und 5 ml 4 M Natronlauge bei 90°C aktiviert und sofort bei 80°C mit L-Histidin umgesetzt (0.5 g L-Histidin in 20 ml Wasser, pH 12). Das fertige Filterschichtmaterial wurde mit 1 M Natriumchlorid und Wasser gewaschen. Auch hier wurden die Mischungsverhältnisse von Festkörper und Reaktionslösungen so gewählt, daß schüttelbare Suspensionen entstanden.

Entsprechende Vorschriften werden angewandt für das Coating mit anderen Polymeren und anderen Filterschichtmaterialien sowie die kovalente Bindung mit anderen endotoxin-spezifischen Liganden.

### 3. Abreicherungsexperimente

Alle Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von Endotoxinen an den Filterschichten wurden bei Raumtemperatur im Dead-end-Modus durchgeführt.

Je eine Filterschichtscheibe wurde am Boden einer Ultrafiltrationszelle (Filterschichtfläche 13.4 cm<sup>2</sup>) fixiert und mit 30% ethanolischer 0.1 M Natronlauge, 1.5 M Natriumchlorid-Lösung und pyrogenfreiem Wasser gewaschen, um Endotoxin-Spuren zu entfernen. Nach Equilibrierung der Filterschicht wurden jeweils 20 ml kontaminiertes Lösung mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min durch die Filterschicht filtriert. Das Filtrat wurde gesammelt und im LAL-

Test untersucht.

### 4. Endotoxin-Test

Zur Endotoxin-Quantifizierung in den Ausgangslösungen und Filtraten wurde ein chromogener Limulus Amöbozyt-Lysat Test (LAL-Test) eingesetzt. Dieser Test beruht darauf, daß Endotoxin die Freisetzung des Chromogens p-Nitroanilin induziert, wobei zwischen der freigesetzten Menge p-Nitroanilin und der vorliegenden Endotoxin-Konzentration im Bereich 0 bis 1.2 EU/ml ein linearer Zusammenhang besteht. Aus der photometrischen p-Nitroanilin-Bestimmung kann mit Hilfe einer Kalibriergeraden (Standard-Endotoxin E. coli 0111:B4) auf die Endotoxin-Konzentration der Proben geschlossen werden.

Der LAL-Test wurde in Europa 1985 von der Europäischen Arzneibuch-Kommission zur Prüfung auf Endotoxine eingeführt und ersetzt seit 1989 auch in der Monographie "Wasser für Injektionszwecke"<sup>1</sup> den Kaninchen-Test.

### Anwendungsbeispiele

#### 1. (Fig. 5) Abreicherung aus hochbelasteten Pufferlösungen

Feed: 20 ml 20 nM pHospHapuffer (pH 7) mit 6000 EU/ml versetzt

Die mit -d gekennzeichneten Filterschichten stellen Filterschichten dar, bei denen auf Inkorporation eines Spacers verzichtet wurde.

#### 2. (Fig. 6 bis 7) Abreicherung aus Endotoxin-angereicherten BSA-Lösungen

Feed: 20 ml 20 nM pHospHapuffer (pH 4,66) mit 1 mg/ml BSA und 6610 EU/ml versetzt

Proteinwiederfindung BSA

#### 3. (Fig. 8) Abreicherung aus Handels-BSA

Feed: 20 ml 20 nM pHospHapuffer (pH 4, 66) mit 1 mg/ml BSA

Endotoxin-Konzentration 65 EU/ml

#### 4. (Fig. 9 bis 10) Abreicherung aus Handels-Lysozym

Feed: 20 ml 20 nM pHospHapuffer (pH 7) mit

1 mg/ml Lysozym

Endotoxin-Konzentration 134 EU/ml

Proteinwiederfindung Lysozym

#### 5. (Fig. 11 bis 12) Abreicherung aus MAX 16 H 5

Feed: 20 ml 20 nM pHospHapuffer (pM 5,5) mit 3 mg/ml Protein

Endotoxin-Konzentration 62,5 EU/ml

Proteinwiederfindung IgG

#### 6. Abreicherung aus bereits aufgereinigtem bFGF

Feed: 5 ml bFGF, das 9 EU/ml enthielt

Es wurde das Abreicherungsverfahren einer PEI-Filterschicht untersucht. Im Filtrat waren noch 0,202 EU/ml nachweisbar.

#### 7. Abreicherung aus Milli-Q-Wasser, das mit Endotoxin versetzt wurde

Feed: 1 l Wasser mit 270 EU/ml versetzt

Zur Abreicherung wurden eine PEI- und eine DAHHis-Filterschicht eingesetzt.

PEI-Filtrat: < 0,015 EU/ml

DAHHis-Filtrat: 0,07 EU/ml

### Patentansprüche

1. Mikrofiltrationsfilterschicht zur Abrechnung von Endotoxinen aus flüssigen Medien, insbesondere Wasser, Proteinslösungen oder Parenteralien, gekennzeichnet durch kovalent gebundene Liganden für Endotoxin.

xine, wobei die Liganden von einem Polymeren getragen werden, das auf dem Filterschichtmaterial aufgebracht ist.

2. Mikrofiltrationsfilterschicht nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch

- (a) einen endotoxin-spezifischen Liganden, vorzugsweise Histamin, Histidin, Polyethylenimin, Poly-L-lysin oder Polymyxin B und/oder
- (b) einen per se nicht-endotoxin-spezifischen Liganden, vorzugsweise Diaminohexan, Diethylaminoethyl oder Desoxycholat.

3. Mikrofiltrationsfilterschicht nach Anspruch 1 oder

2. gekennzeichnet durch Polysaccharide, z. B. Zellulose, insbesondere regenerierte und mikrokristalline Zellulose und -derivate, insbesondere Zelluloseacetat, Agarose und -derivate, quervernetztes Dextran und -derivate, Chitosan und -derivate,

Synthetische organische Polymere, z. B. Polyacrylnitril, Polysulfon, Polyamid, insbesondere Nylon, Polyvinylalkohol, Polyethylenvinylalkohol, Polystyrol und Polyacrylate sowie deren Derivate.

Anorganische Materialien, z. B. Kieselgel, Glas und keramische Träger sowie deren Derivate als Filterschichtmaterial.

4. Mikrofiltrationsfilterschicht nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch ein hydrophiles Polymere, insbesondere Dextran, Polyvinylalkohol oder modifizierte Zellulose, vorzugsweise Hydroxyethylzellulose.

5. Mikrofiltrationsfilterschicht nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das hydrophile Polymere für sich wasserlöslich oder wasserunlöslich ist.

6. Mikrofiltrationsfilterschicht nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymere von der Filterschicht mit Hilfe eines Spacers getragen wird.

7. Mikrofiltrationsfilterschicht nach Anspruch 6, gekennzeichnet durch einen sich von Bisoxiran, Glutarodialdehyd, Epihalogenhydrin oder Diisocyanat herleitenden Spacer.

8. Mikrofiltrationsfilterschicht nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Liganden von dem Polymeren mit Hilfe eines Spacers getragen werden.

9. Mikrofiltrationsfilterschicht nach Anspruch 8, gekennzeichnet durch einen sich von Bisoxiran, Glutarodialdehyd, Epihalogenhydrin oder Diisocyanat herleitenden Spacer, gegebenenfalls nach oxidativer Aktivierung.

10. Verwendung einer Mikrofiltrationsfilterschicht gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zum Entfernen von Endotoxinen aus flüssigen Medien, insbesondere aus Wasser, Proteinlösungen oder Parenteralien.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

---

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

---

- Leerseite -

Fig. 1: Schematischer Aufbau einer gecoateten Filterschicht auf der Basis von Nylon als Filterschichtmaterial

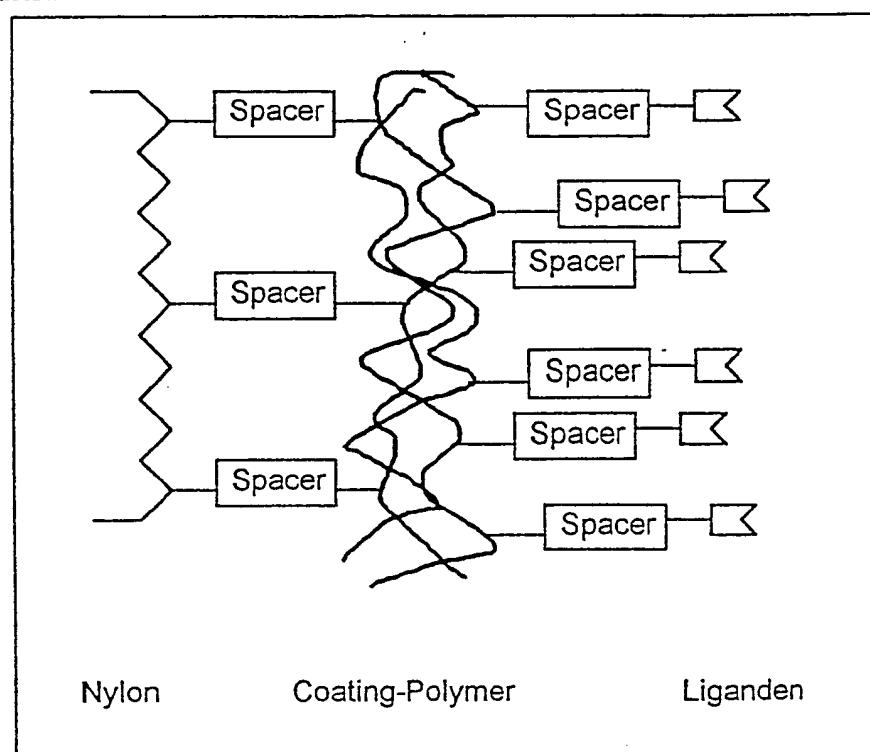


Fig. 2: Aktivierung der Matrix an terminalen Stickstoffgruppen (a) und Kopplung eines Polymers ROH (b)

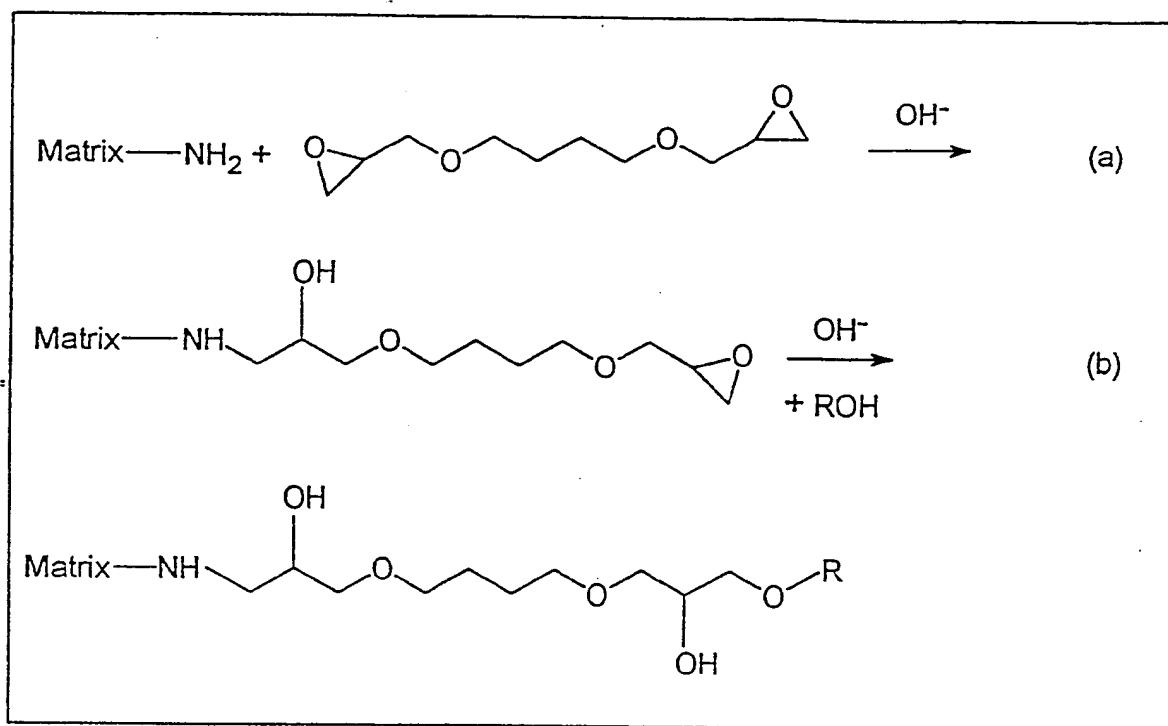


Fig. 3: Unspezifische Proteinadsorption an verschiedenen Polymergecoateten Filterschichten

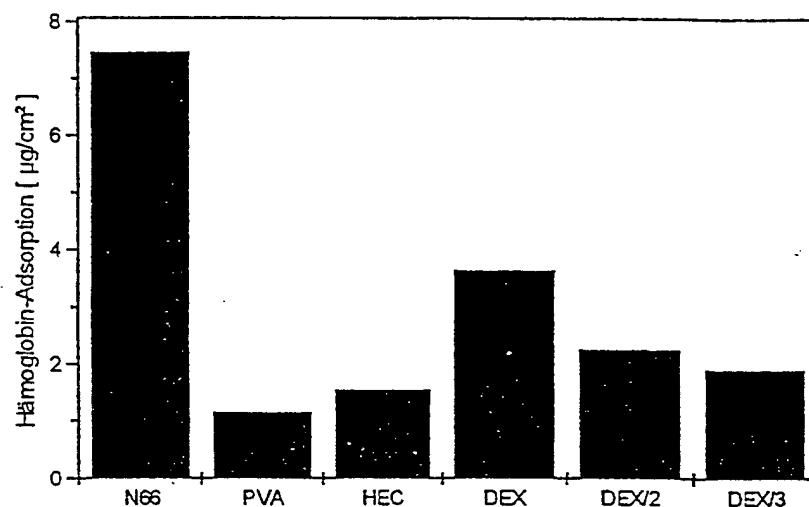
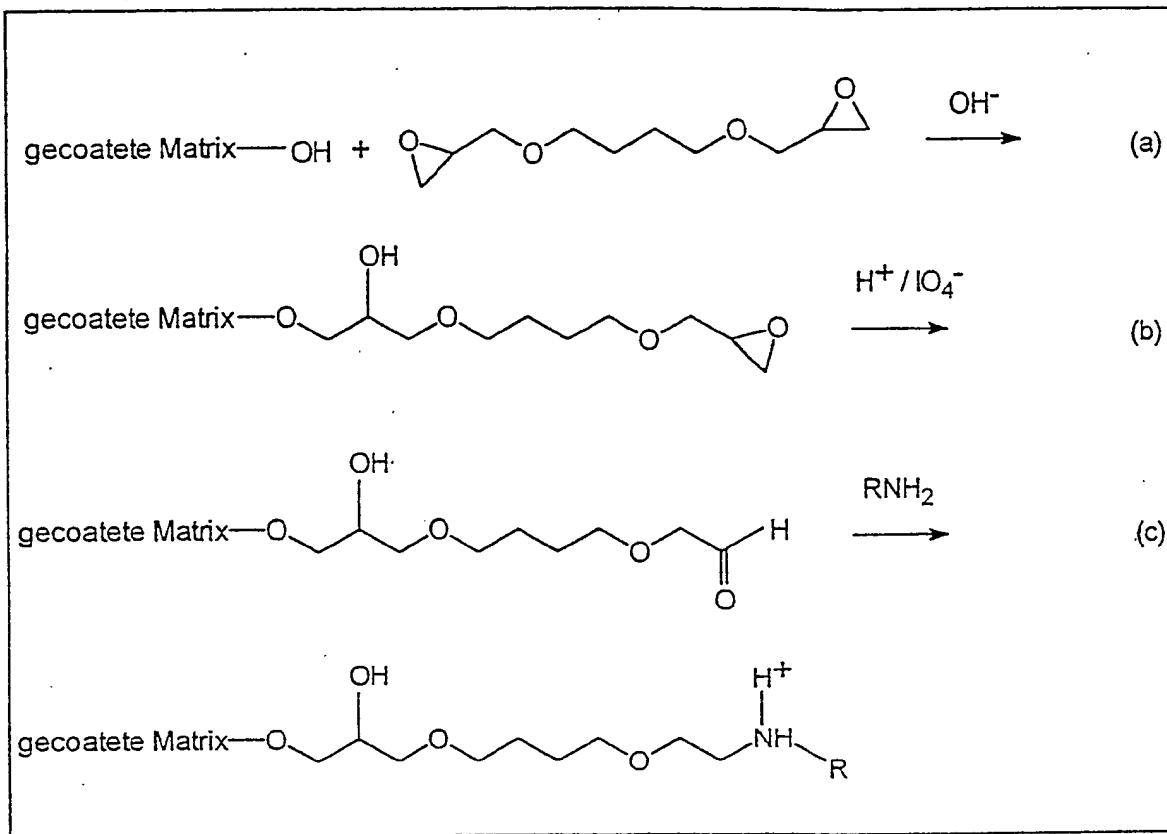
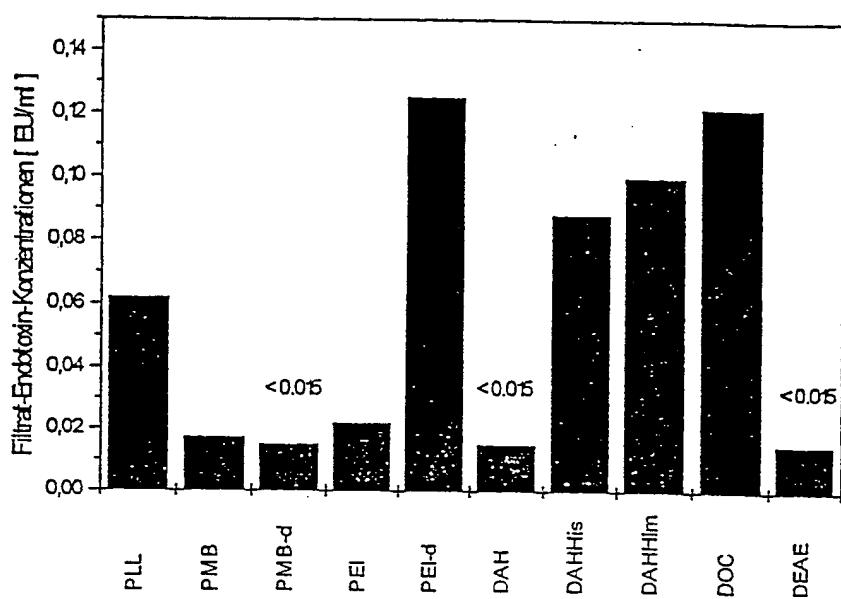


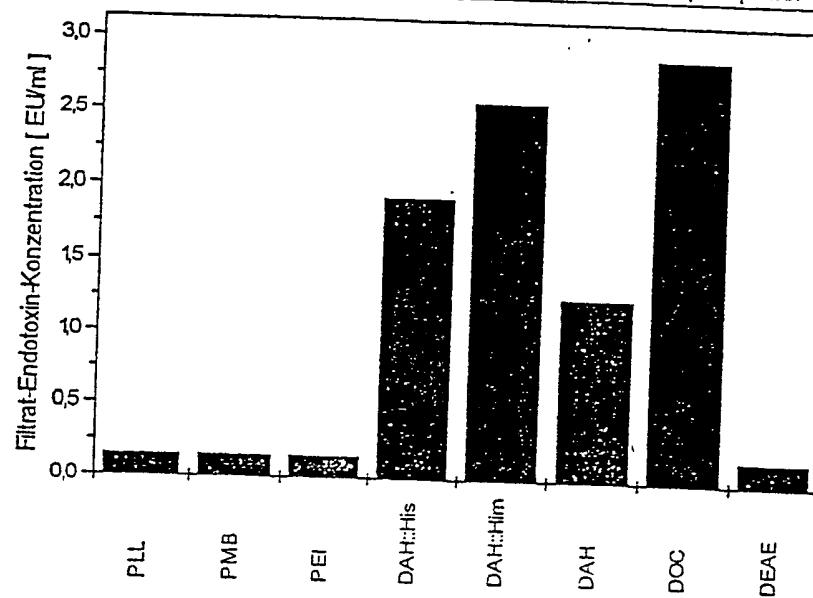
Fig. 4: Aktivierung der gecoateten Filterschichtmaterialien an freien Hydroxylgruppen (a), Hydrolyse und Periodat-Spaltung (b), Kopplung von Stickstoff-Liganden (c).





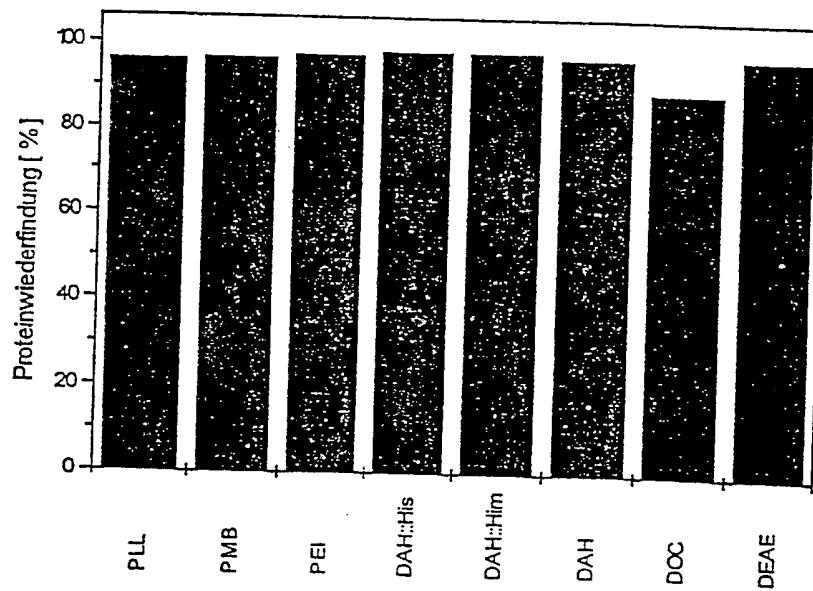
Figur 5

Endotoxin-Abreicherung aus kontaminierten BSA-Lösungen  
Feed : 1 mg/ml BSA, 6619 EU/ml in 20 mM Phosphatpuffer - pH 4,66

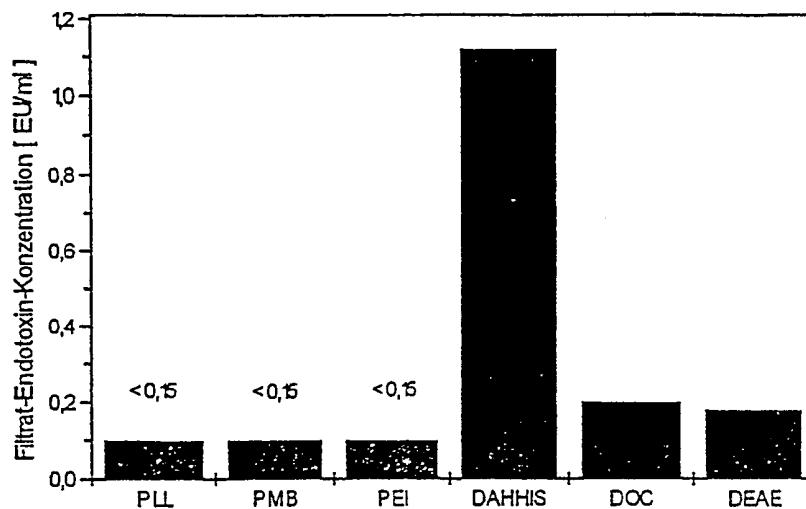


Figur 6

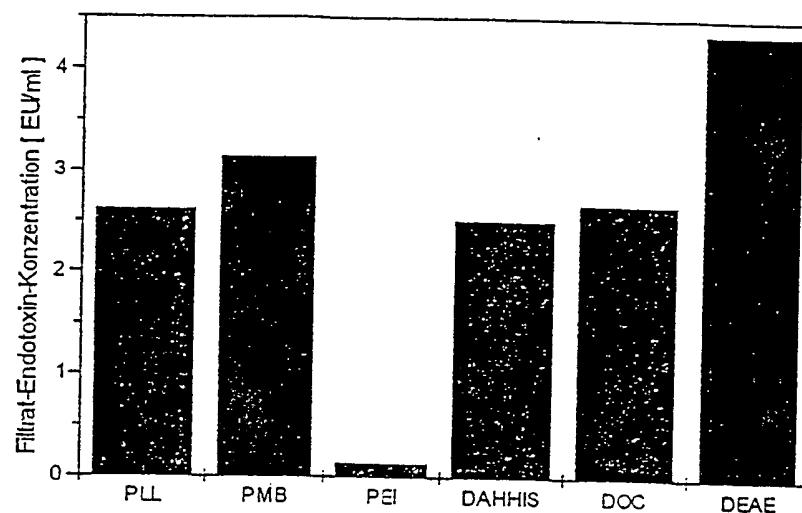
Proteinwiederfindung bei pH 4,66



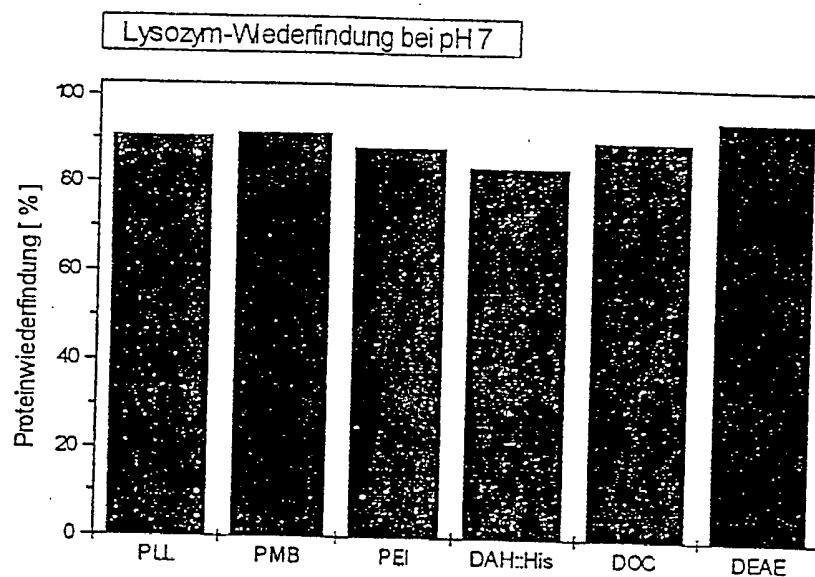
Figur 7



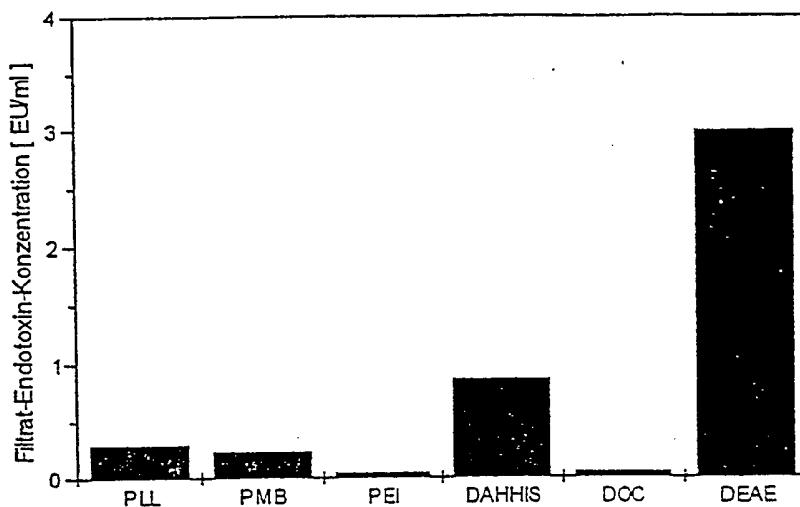
Figur 8



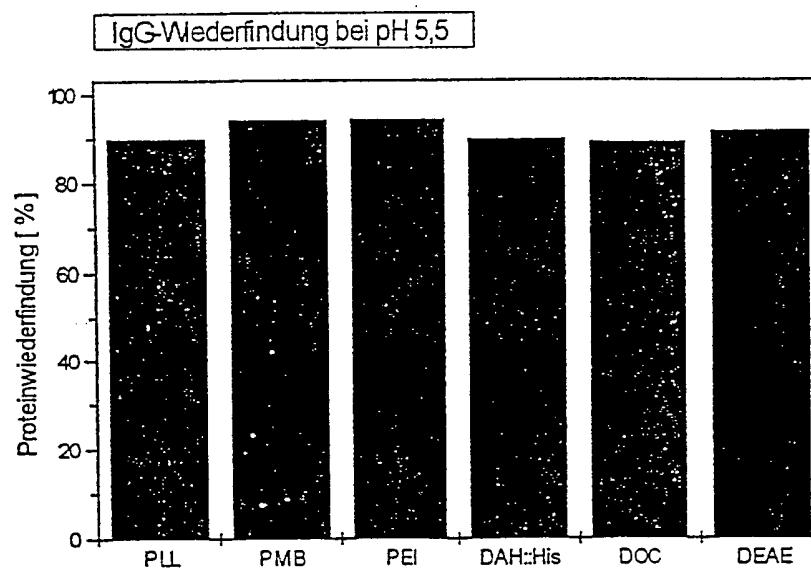
Figur 9



Figur 10



Figur 11



Figur 12